Iranian Journal of Pulses Research
Homepage: https://ijpr.um.ac.ir
Vol. 14, No. 1, June 2023, p. 63-74
Original Research; DOI: 10.22067/ijpr.v14i1.89106




پژوهش‌های حبوبات ایران
سال(دوره)۱۴ شمارهٔ۱، نیمهٔ اوّل ۱۴۰۲
صفحهٔ ۷۴-۶۳، نوع مقاله: پژوهشی

سبب‌شناسی بیماری‌های پوسیدگی ریشه، زردی و پژمردگی نخود در استان کرمانشاه

بهمن گرامی‌نسب[1]، سعید عباسی[2]*، صمد جمالی[3]، خسرو چهری[4] و حسن یونسی[5]

۱- دانش‌آموختهٔ کارشناسی‌ارشد بیماری‌شناسی گیاهی، گروه گیاه‌پزشکی، دانشگاه رازی، کرمانشاه؛
bahman_geraminasab@yahoo.com
۲- دانشیار بیماری‌شناسی گیاهی، گروه گیاه‌پزشکی، دانشگاه رازی، کرمانشاه؛ abbasikhs@yahoo.com
۳- استادیار بیماری‌شناسی گیاهی، گروه گیاه‌پزشکی، دانشگاه رازی، کرمانشاه؛ jamali454@yahoo.com
۴- استادیار قارچ‌شناسی، گروه زیست‌شناسی، دانشگاه رازی، کرمانشاه؛ khchehri@gmail.com
۵- مربی پژوهشی بخش تحقیقات گیاه‌پزشکی، مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان کرمانشاه؛ unesi920@yahoo.com

تاریخ‌ها:
دریافت: ۱۳۹۹/۰۷/۱۹، بازنگری: ۱۴۰۰/۱۱/۳۰، پذیرش: ۱۴۰۱/۰۳/۰۳؛ انتشار آنلاین مقاله: ۱۴۰۲/۰۴/۰۱

نحوه ارجاع به مقاله:
گرامی‌نسب، ب.، عباسی، س.، جمالی، ص.، چهری، خ.، و یونسی، ح. ۱۴۰۲. سبب‌شناسی بیماری‌های پوسیدگی ریشه، زردی و پژمردگی نخود در استان کرمانشاه. پژوهش‌های حبوبات ایران ۱۴(۱): ۷۴-۶۳.

چکیده

پوسیدگی‌های ریشه و پژمردگی نخود، مخرب‌ترین‌بیماری‌های محدودکنندهٔ تولید نخود در استان کرمانشاه به شمار می‌روند. با این حال، اتیولوژی این بیماری‌ها به طور کامل بررسی نشده است. طی فصول زراعی ۹۰-۹۴، از ۱۹۴ مزرعه نخود در مناطق مختلف استان کرمانشاه بازدید شد و از هر مزرعه، حداقل چهار بوتهٔ مشکوک به بیماری، به منظور جداسازی بیمارگر استفاده شد. بر اساس خصوصیات ریخت‌شناختی، هشت گونهٔ قارچی شامل *Fusarium oxysporoum*، *F. solani*، *F. proliferatum*، *F. equiseti*، *F. verticillioides*، *F. culmorum*، *Macrophomina phaseolina* و *Rhizoctonia solani* شناسایی گردید. از بین جدایه‌های پرشمار به‌دست‌آمده، ۲۸۸ جدایه از نظر بیماری‌زایی و پرآزاری مورد ارزیابی قرار گرفتند. بر اساس نتایج آزمون بیماری‌زایی، به استثنای گونه‌های *F. verticillioides* و *F. culmorum* سایر گونه‌ها بیماری‌زا شناخته شدند. در این میان، گونه‌های *F. oxysporum* و *F. solani* شایع‌ترین و پرآزارترین گونه‌های بیمارگر شناخته شدند. بر همین اساس، گونه‌های *F. equiseti* و *F. proliferatum* در زمرهٔ بیمارگرهای ضعیف و کم‌آزار قرار گرفتند. این اولین گزارش از بیماری‌زایی *F. proliferatum* بر روی نخود است. در این مطالعه، بروز تغییر رنگ آوندی که مشخصهٔ اصلی جدایه‌های بیماری‌زای *F. oxysporum* است، بر خلاف انتظار، فقط در تعداد معدودی از گیاهان مایه‌زنی‌شده مشاهده شد. این نشان می‌دهد که بیشتر جدایه‌های به‌دست‌آمده از این گونهٔ مرکب به فرم مخصوص *F. oxysporum* f. sp. *ciceri* تعلق ندارند. با توجه به مرکب‌بودن گونهٔ *F. oxysporum* و عدم کفایت ویژگی‌های ریخت‌شناسی در شناسایی این بیمارگر، برای تدوین درست اقدامات مدیریتی لازم است شناسایی این بیمارگر با استفاده از روش‌های مولکولی تأیید شود.

واژه‌های کلیدی: رایزوکتونیا؛ زردی؛ فوزاریوز؛ فوزاریوم؛ ماکروفومینا

مقدمه

نخود (*Cicer arietinum* L.) پس از لوبیا و نخود فرنگی سومین محصول حبوبات است که در گستره‌ای وسیع در بیش از ۵۰ کشور جهان کشت می شود. از نظر سطح زیر کشت، ایران با داشتن ۳/۹ درصد از سطح زیرکشت این محصول در بین کشورهای تولید کننده نخود، پس از هند، استرالیا و پاکستان در رده چهارم قرار دارد (Fao, 2017). نخود، محصولی با ارزش و غنی از پروتئین است (Muehlbauer & Sarker, 2017). صرف نظر از ارزش غذایی، کشت نخود در تناوب با غلات به‌ویژه در مناطق خشک و نیمه خشک مانند ایران، از طریق تثبیت نیتروژن هوا، نقش اساسی در حفظ و مدیریت باروری خاک دارد (Aslam *et al.*, 2003). در ایران،

* نویسنده مسئول: abbasikhs@yahoo.com

نخود در بین حبوبات رتبه نخست را دارد. براساس آمارنامه کشاورزی، ۶۲/۸ درصد از سطح زیرکشت و ۳۹/۷ درصد از تولید حبوبات در کشور به نخود اختصاص دارد. به استناد همین آمارنامه، در بین استان‌های تولیدکننده نخود در ایران، استان کرمانشاه، رتبه اول تولید نخود را به خود اختصاص داده است (Ahmadi *et al.*, 2018). این محصول، در استان کرمانشاه در شرایط دیم کشت می شود.

بیش از ۱۷۰ بیمارگر گیاهی مرتبط با گیاه نخود گزارش شده است که از این میان *Fusarium oxysporum* (Padwick) f. sp. *ciceris* Matuo & Sato خسارت‌بارترین بیمارگر محسوب می‌شود (Nene *et al.*, 1996). این بیمارگر از تمامی مناطقی کشت گیاه نخود در آسیا، آفریقا، اروپای جنوبی و آمریکا گزارش شده است (Chand & Khirbat, 2009). قارچ *F. oxysporum* سبب پژمردگی آوندی شده و تولید نخود را متأثر می‌سازد(Jiménez-Díaz *et al.*, 2015). قارچ *Fusarium oxysporum* دارای بیش از ۷۰ فرم تخصص یافته مختلف است که در بیش از ۱۰۰ گونهٔ گیاهی سبب پژمردگی آوندی و پوسیدگی ریشه می‌شوند (Gordon and Martyn, 1997). در واقع اختصاصی بودن میزبان‌های جدایه‌های مختلف قارچ سبب شد اسنایدر و هانسن این‌گونه را به فرم‌های تخصص‌یافته‌ای بر اساس توانایی جدایه‌ها در ایجاد بیماری روی یک میزبان خاص و یا گروه خاصی از میزبان‌ها طبقه‌بندی نمایند (Snyder and Hansen, 1940). آنالیز ترادف نوکلئیک اسید نشان داده است که بسیاری از این فرم‌های مخصوص پلی‌فایلتیک یا پارافایلتیک هستند (O'donnell *et al.*, 1998).

پوسیدگی سیاه ریشه ناشی از *Fusarium solani*، اگرچه از نظر اهمیت در درجهٔ دوم قرار می‌گیرد، اما در مناطقی که این بیمارگر در خاک حضور داشته باشد، خسارت‌های قابل توجهی را به محصول وارد می‌کند(Nene *et al.*, 2012). گونهٔ مرکب *F. solani* به عنوان تنها گونهٔ موجود در بخش *Martiella* از اهمیت بسیاری در کشاورزی برخوردار است. ارزیابی طبقه‌بندی مجدد قارچ‌ها برپایهٔ مطالعات تبارزایشی مولکولی نشان داده است که *F. solani* گونه‌ای مرکب است که حداقل شامل ۶۰ گونهٔ فیلوژنتیک متمایز می‌باشد(Aoki et al., 2014). دامنهٔ میزبانی این قارچ خاکزاد در بین ۶۶ تیره گیاهی، ۱۱۱ گونه و ۸۷ جنس، گزارش‌شده است (Kolattukudy, 1995). وجود دامنهٔ وسیع میزبانی خود به نوعی مرکب بودن این گونهٔ را تقویت می‌کند(Leslie and Summerell, 2008). در واقع، هر چند گونهٔ مرکب FSSC از دامنهٔ میزبانی وسیعی برخوردار است، ولی گونه‌های منفرد هر یک طیف محدودی از گونه‌های گیاهی را مورد حمله قرار می‌دهند. بر همین اساس جمعیت‌های این گونه مرکب در قالب ۱۲ فرم مخصوص تقسیم شده‌اند(Bueno *et al.*, 2014; Chung *et al.*, 2011). در مورد حبوبات به صورت پیش‌فرض جدایه‌های به‌دست‌آمده از یک میزبان خاص را با عنوان فرم مخصوص آن میزبان می‌شناسند و از اصطلاحات *F. solani* f. sp. *phaseoli*، *F. solani* f. sp. *Pisi* و *F. solani* f. sp. *glycines* در مورد آن‌ها استفاده می‌شود (Aoki *et al.*, 2014; Matuo and Snyder, 1972).

در ایران، بیماری‌های پژمردگی و پوسیدگی ریشه، معمولاً در تمام فصول رشد و در همه مزارع نخود از جمله در استان کرمانشاه بروز کرده و تولید این محصول را متأثر می‌سازند. تاکنون عوامل مختلف قارچی از جمله گونه‌های مختلف *Fusarium* به خصوص *Fusarium oxysporum* و *F. solani* به عنوان عوامل پژمردگی و بوته‌میری نخود در ایران معرفی شده‌اند (Mohammadi & Banihashemi, 2005). با این حال، همچنان ابهامات زیادی در مورد جایگاه تاکسونومیکی و بیماری‌زایی این گونه‌های قارچی وجود دارد. از این رو، مطالعهٔ حاضر با هدف شناسایی گونه‌های قارچی مسبب پژمردگی، زردی و پوسیدگی ریشه در استان کرمانشاه، شناسایی گونهٔ غالب و تعیین میزان شیوع بیماری در مناطق مختلف استان به اجرا در آمد.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری

طی فصول زراعی ۹۰-۹۴، ۱۹۴ مزرعهٔ نخود با فاصله حداقل ده کیلومتر در مناطق مختلف استان کرمانشاه شامل شهرستان‌های کرمانشاه (۲۲ مزرعه)، اسلام‌آباد غرب(۱۷ مزرعه)، دالاهو(۱۶ مزرعه)، گیلان‌غرب(۱۵ مزرعه)، سرپل ذهاب(۱۶ مزرعه)، قصرشیرین(۸ مزرعه)، روانسر(۱۶ مزرعه)، جوانرود(۱۴ مزرعه)، پاوه(۷ مزرعه)، هرسین(۱۶ مزرعه)، صحنه(۱۵ مزرعه)، سنقر (۱۷ مزرعه) و کنگاور (۱۵ مزرعه) مورد بازدید قرار گرفت. از هر مزرعه، حداقل چهار بوته که دارای نشانه‌های زردی، پژمردگی و پوسیدگی ریشه بودند، جمع‌آوری شد. نمونه‌های آلوده پس از ثبت مشخصات کامل از جمله نشانه‌های بیماری، موقعیت مزرعه، منطقه، نوع کشت و تاریخ نمونه‌برداری به آزمایشگاه منتقل شدند. پس از انتقال نمونه‌ها به آزمایشگاه، در اسرع وقت نسبت به کشت نسوج آلوده و جداسازی بیمارگر اقدام شد.

جداسازی بیمارگر

تفکیک و شناسایی گونه‌های قارچی جداسازی‌شده

با توجه به کثرت جدایه‌های قارچی، پس از شناسایی مقدماتی، از هر مزرعه، یکی از جدایه‌های به‌دست‌آمده از هر گونه، انتخاب و جهت مطالعات بعدی مورد استفاده قرار گرفت. شناسایی گونه‌های قارچی با توجه به خصوصیات میکروسکوپی و ماکروسکوپی با استفاده از منابع و کلیدهای تاکسونومیکی معتبر صورت گرفت (Sneh *et al*., 1991; Leslie & Summerell, 2008). در مورد جدایه‌های فوزاریوم جهت تحریک جدایه‌ها به هاگ‌زایی و تولید ماکروکنیدیوم، تشکیل زنجیره میکروکنیدیوم و مشاهده کلامیدوسپورها از محیط کشت برگ‌میخک – آگار (CLA) استفاده شد (Fisher *et al*., 1982).

جدایه‌های منتخب، جهت نگه‌داری بلند مدت در سطح شیب‌دار PDA درون لوله‌های آزمایش درپیچ‌دار یا به صورت بذرهای کلونیزه شده یولاف در داخل میکروتیوب در دمای$4^{\circ}C$ نگه‌داری شدند.

آزمون اثبات بیماری‌زایی

از بین جدایه‌های پرشمار به‌دست‌آمده، ۲۸۸ جدایه از نظر بیماری‌زایی و پرآزاری مورد ارزیابی قرار گرفتند. تهیه زادمایه بیمارگر مطابق روش وسترلاند و همکاران (Westerlund *et al*., 1974) صورت گرفت، با این تفاوت که از بذر یولاف به جای بذر گندم استفاده شد. به منظور تهیه زادمایهٔ بیمارگر، بذرهای یولاف به مدت ۲۴ ساعت در آب خیسانده شده و طی دو مرحله، به فاصله ۲۴ ساعت به مدت ۲۰ دقیقه در دمای$^{\circ}C$ ۱۲۰ در دستگاه اتوکلاو سترون شدند. سپس هریک از جدایه‌های قارچی در پنج تشتک پتری حاوی محیط کشت PDA کشت داده شده و بذرهای سترون یولاف به درون تشتک‌های پتری اضافه شد. تشتک‌های پتری به مدت حداقل دو هفته یعنی تا زمانی که قارچ کاملاً سطح بذرهای یولاف را در بر بگیرد در انکوباتور با دمای $^{\circ}C$ ۲۵ نگه‌داری شدند. پس از گذشت مدت زمان مذکور، بذور یولاف که با قارچ عامل بیماری کلونیزه شده بودند به عنوان زادمایهٔ بیمارگر مورد استفاده قرار گرفتند. برای آزمون بیماری‌زایی ازگلدان‌هایی به قطر داخلی ۴ و ارتفاع ۱۲ سانتی‌متر استفاده شد. گلدان‌های مذکور تا ارتفاع شش سانتی‌متری از خاک و ماسه سترون (به نسبت ۲ به ۱) پر شده و سپس دو گرم زادمایهٔ بیمارگر در سطح خاک قرار داده شد. سپس تا ارتفاع ۹ سانتی‌متری خاک سترون اضافه شده و دو عدد بذر نخود رقم بیونیج، پس از ضدعفونی سطحی با استفاده از هیپوکلریت سدیم یک درصد به مدت یک دقیقه، در سطح خاک قرار داده شد. در نهایت بذرها با دو سانتی‌متر خاک سترون پوشانده شدند. در این آزمون، برای هر جدایه سه تکرار در نظر گرفته شد. در مورد گلدان‌های شاهد از بذر یولاف اتوکلاو شده به جای مایهٔ بیمارگر استفاده شد. گلدان‌های مذکور به مدت حداکثر پنج تا شش هفته در اتاقک رشد و در دمای $^{\circ}C$۲۸- ۲۵ نگه‌داری شدند. در این مدت، بروز نشانه‌های بیماری ثبت شد. در پایان، تمام بوته‌ها از گلدان بیرون آورده شده و برای تعیین وضعیت بیماری‌زایی و تعیین شدت آلودگی مورد ارزیابی قرار گرفتند. جهت ارزیابی شدت بیماری‌زایی جدایه‌ها از مقیاس ۰-۴ به شرح زیر استفاده شد (Landa *et al*., 2006):

۰ = صفر(عدم آلودگی)

۱ = درصد ریشه‌های پوسیده یا زردی و نکروز برگ‌ها از یک تا ۳۳ درصد

۲ = درصد ریشه‌های پوسیده یا زردی و نکروز برگ‌ها از ۳۴ تا ۶۶ درصد

۳= درصد ریشه‌های پوسیده یا زردی و نکروز برگ‌ها از ۶۷ تا ۱۰۰ درصد

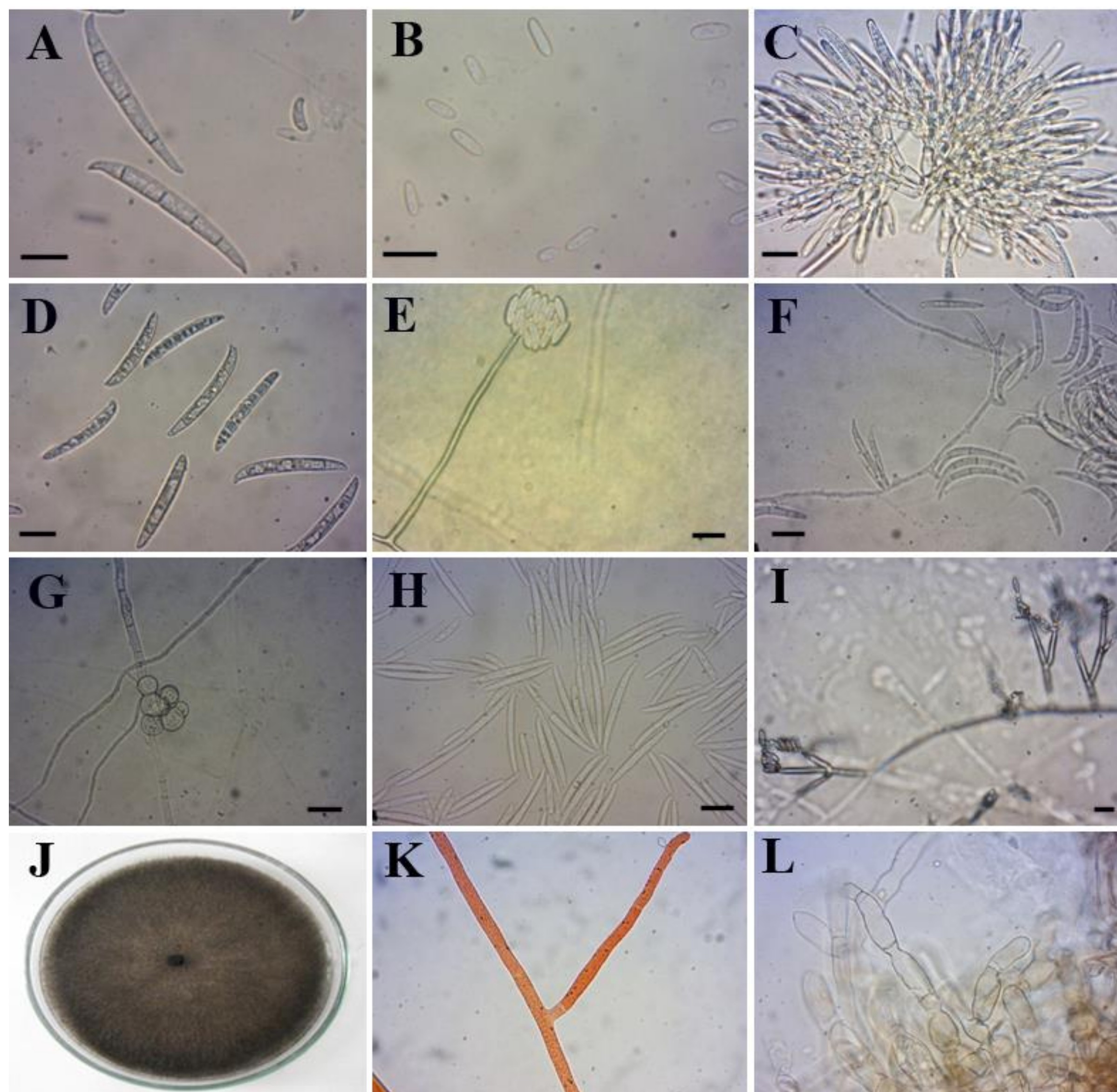
۴= مرگ کامل گیاه

در مورد هریک از گونه‌های قارچی ضمن جداسازی مجدد جدایه‌های مایه‌زنی شده از بافت بیمار و تطبیق آن با مشخصات گونهٔ مایه‌زنی شده اصول کخ اجرا شده و بیماری‌زایی آنها به اثبات رسید.

نتایج و بحث

شناسایی گونه‌های قارچی جداسازی‌شده و فراوانی آنها

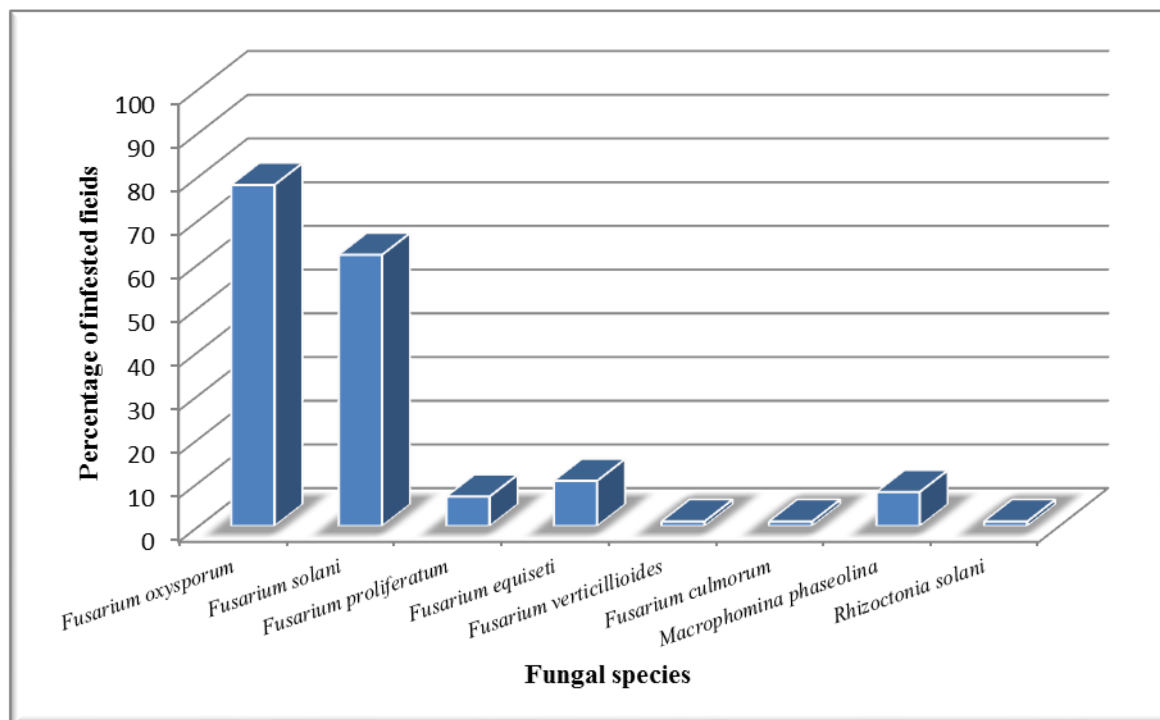
در این مطالعه، بر پایهٔ ویژگی‌های ریخت‌شناختی، هشت گونهٔ قارچی مرتبط با بیماری‌های زردی و پژمردگی نخود شناسایی شد که در این میان، شش گونه به جنس فوزاریوم تعلق داشتند. گونه‌های فوزاریوم به ترتیب فراوانی شامل *F. oxysporum* (شکل ۱، A و B)، *F. solani* (شکل ۱، C، D و E)، *F. proliferatum* (شکل ۱، H و I)، *F. equiseti* (شکل ۱، F و G)، *F. verticillioides* و *F. culmorum* بودند. افزون بر این، قارچهای *Macrophomina phaseolina* (شکل ۱، J) و *Rhizoctonia solani* (شکل ۱، K و L) از تعداد معدودی از نمونه‌های آلوده جداسازی گردید.



شکل ۱- ویژگی‌های ریخت‌شناختی جدایه‌های قارچی به دست‌آمده از نمونه‌های آلوده نخود. ماکروکنیدیوم‌ها (A) و میکروکنیدیوم‌های (B) گونۀ *Fusarium oxysporum*. اسپورودوخیوم (C)، ماکروکنیدیوم‌ها (D)، فیالید و سردروغی (E) گونۀ *Fusarium solani*. ماکروکنیدیوم‌ها (F) و کلامیدوسپورهای (G) گونۀ *Fusarium equiseti*. ماکروکنیدیوم‌ها (H) و فیالیدهای (I) گونۀ *Fusarium proliferatum*. پرگنۀ قارچ *Macrophomina phaseolina* (J). ریسه‌ها (K) و سلول‌های تسبیح مانند (L) قارچ *Rhizoctonia solani*

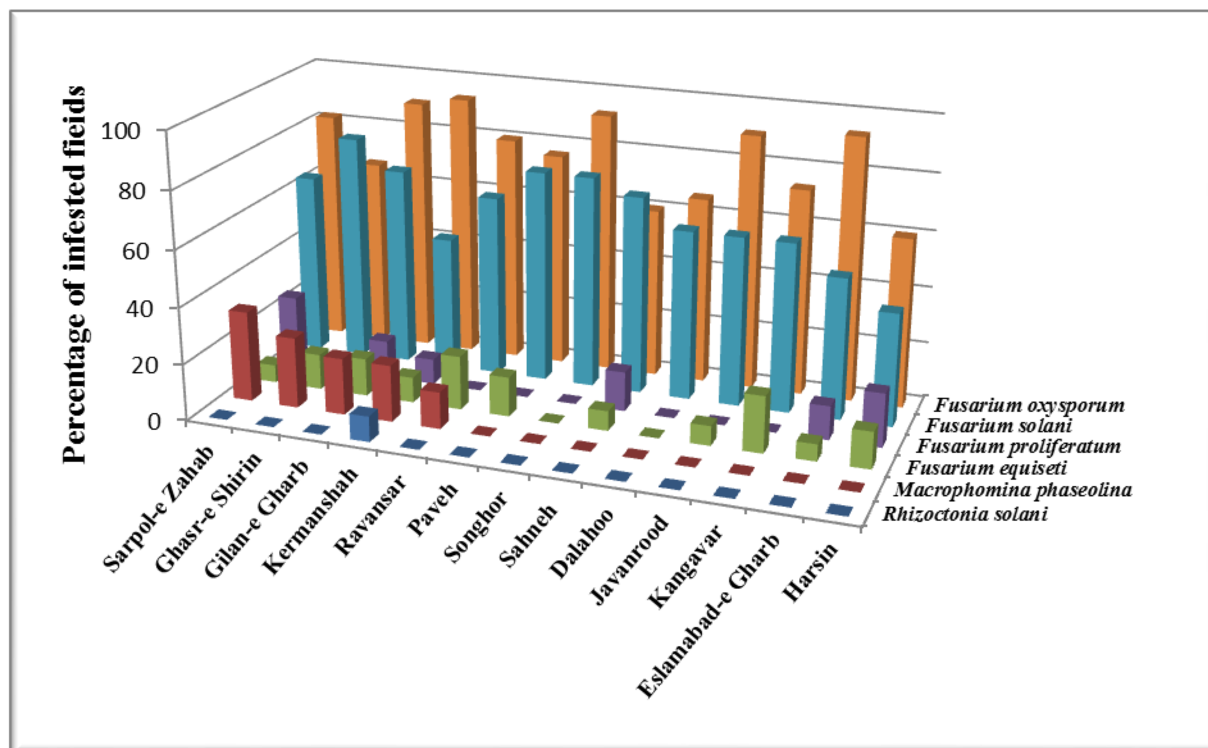
(مقیاس= ۱۰ میکرومتر).

Fig. 1. Morphological characteristics of fungal isolates obtained from infected chickpeas. Macroconidia (A) and Microconidia (B) of *Fusarium oxysporum*. Sporodochium (C), Macroconidia (D), Phialides and False head (E) of *Fusarium solani*. Macroconidia (F) and Chlamydospores (G) of *Fusarium equiseti*. Macroconidia (H) and and Phialides (I) of *Fusarium proliferatum*. Colony of *Macrophomina phaseolina* (J). Hypha(K) and Moniloid cells(L) of *Rhizoctonia solani*. Scale bar = 10 µm.



شکل ۲- فراوانی گونه‌های قارچی جداسازی شده از مزارع نخود آلوده به بیماری‌های زردی، پژمردگی و پوسیدگی ریشه.

Fig. 2. Prevalence of fungal species isolated from chickpea fields showing yellowing, Wilting and root rot symptoms.



شکل ۳- پراکنش گونه‌های قارچی جداسازی شده از مزارع نخود آلوده به بیماری‌های زردی و پژمردگی

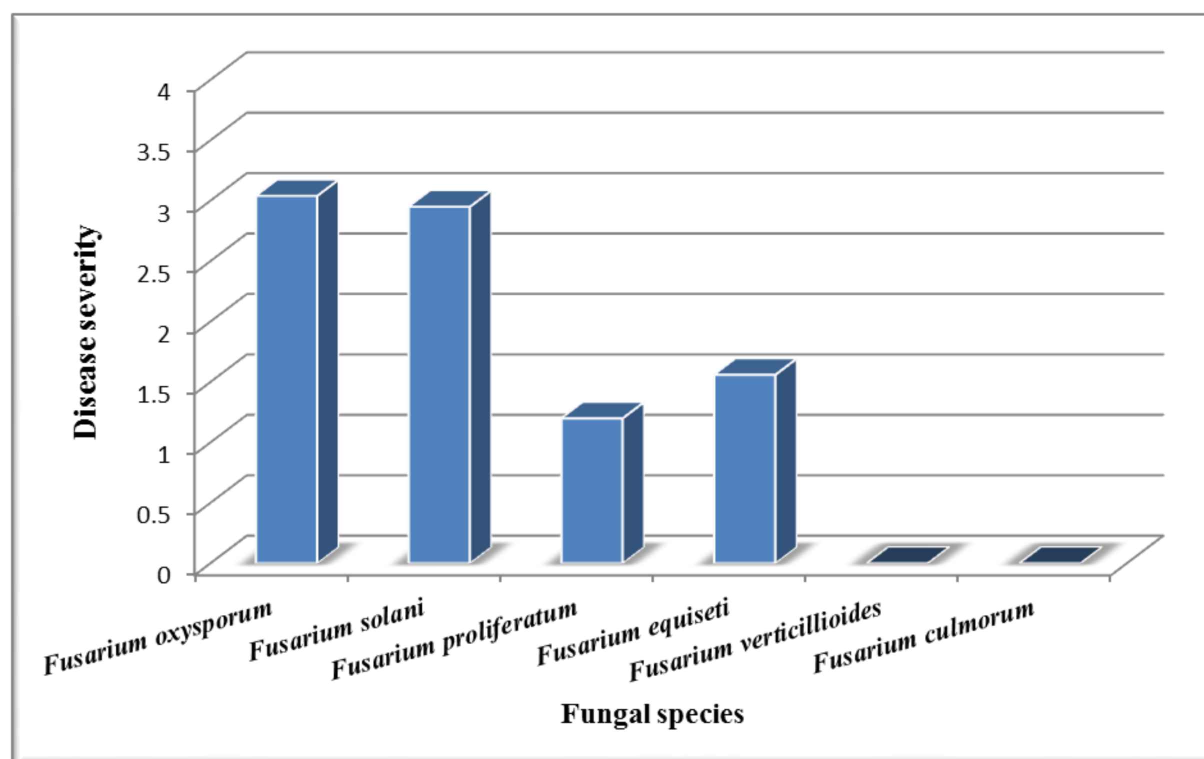
Fig. 3. Distribution of fungal species isolated from chickpea fields affected by wilt and yellows diseases

از مجمـــوع ۱۹۴ مزرعـــهٔ مـــورد بازدیـــد، قـــارچ *F. oxysporum* از نمونـه‌های جمـع‌آوری شـده از ۱۵۱ مزرعـه، *F. solani* از ۱۱۷ مزرعه، *F. proliferatum* از ۱۳ مزرعه، *F. equiseti* از ۲۰ مزرعه، *F. verticillioides* از دو مزرعـه، *F. culmorum* از دو مزرعـه، *Macrophomina phaseolina* از ۱۵ مزرعـه و *Rhizoctonia solani* از دو مزرعـه جداسـازی گردید(شکل ۲).

قارچ‌های *F. oxysporum* و *F. solani* پراکنش وسـیعی در سراسر استان داشتند و از تمامی شهرستان‌های مورد بازدید جداسازی شدند. اما پـراکنش سـایر گونـه‌های قـارچی گسـترهٔ محدوتری داشت. در ایـن میـان، جدایـه‌های *M. phaseolina* عمدتاً از مناطق گرمسیر استان جداسازی شدند(شکل ۳).

آزمون بیماری‌زایی و ارزیابی شدت بیماری‌زایی جدایه‌ها

بر اساس نتایج آزمون بیماری‌زایی، به اسـتثنای گونـه‌های *F. verticillioides* و *F. culmorum* سـایر گونـه‌های جداسازی شده بیماری‌زا شناخته شدند. همچنین ارزیابی شدت بیماری نشان داد که جدایه‌های *F. oxysporum* و *F. solani* از شدت بیماری‌زایی بیشـتری برخـوردار بـوده و عوامـل اصـلی زردی و بوته‌میری نخود محسوب می‌شوند(شکل ۴).

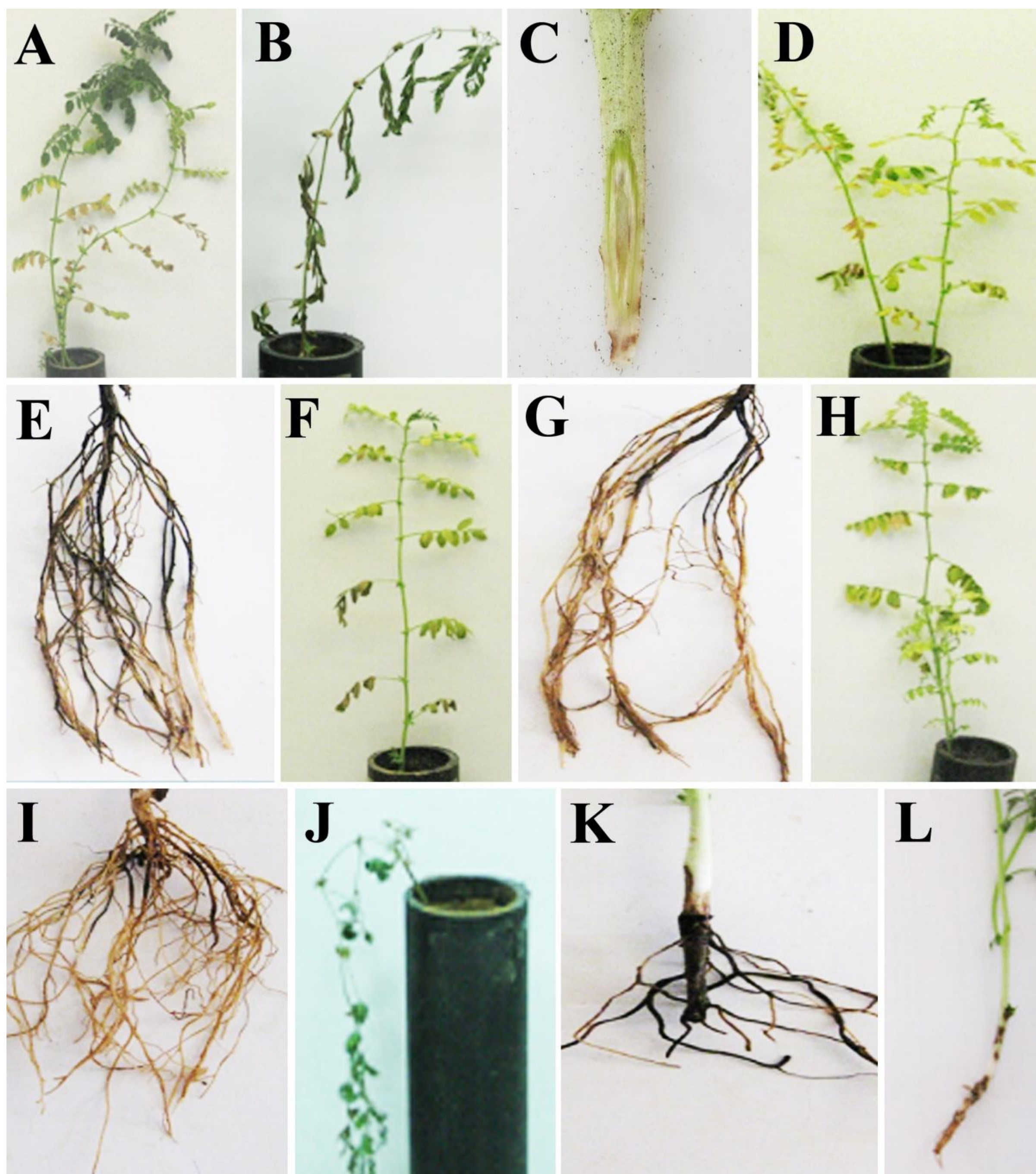


شکل ۴- شدت بیماری‌زایی گونه‌های فوزاریوم جداسازی شده از گیاهان نخود آلوده به زردی فوزاریومی نخود

Fig. 4. Disease severity of *Fusarium* Species Isolated from Fusarium yellows affected Chickpeas

از بـین ۱۵۱ جدایـهٔ منتخـب *Fusarium oxysporum* جـدا شـده از نسـوج آلـودهٔ نخـود، ۱۱۲ جدایـه در آزمـون بیماری‌زایی، قادر به ایجاد بیماری در گیاهچه‌های نخود بودنـد. نشانه‌های بیماری در گیاهچه‌های بیمار متغیر بـوده و درجـات مختلفی از زردی، ریزش برگ‌چه‌ها، بافت مردگـی و بـه نـدرت پژمردگی در قسمت هوایی گیاهان مورد آزمایش مشـاهده شـد. نشانه‌های بیمـاری نخسـت در برگ‌هـای پـایینی بـروز یافتـه و رفته‌رفته تا قسمت‌های بالاتر پیشرفت نمود (شکل ۵، A و B)، در بررسی ریشه گیاهان آلوده، درجـات مختلفـی از پوسـیدگی ریشه مشاهده شد. بر خلاف انتظار، بروز تغییر رنگ آونـدی کـه مشخصهٔ اصلی جدایـه‌های بیمـاری‌زای *F. oxysporum* قـارچ است، فقط در تعداد معدودی از گیاهان مایه‌زنی شـده مشـاهده شد (شکل ۱، C)..

در آزمون اثبات بیماری‌زایی و ارزیابی پرآزاری جدایـه‌های *F. solani*، در مجموع ۸۳ جدایه مورد آزمون قرار گرفتند کـه از این تعداد، ۵۴ جدایه درجات مختلفی از پرآزاری نشان دادند. پوسیدگی ریشه‌های آلوده، سبب بروز نشـانه‌های زردی و بافـت مردگی در قسمت هوایی گیاهان آلوده شد (شکل ۵، D و E).



شکل ۵- نشانه‌های بیماری ناشی از بیمارگرهای قارچی خاک‌زاد جدا شده از نخود. A-C. زردی، پژمرگی و تغییر رنگ آوندی ناشی از *Fusarium oxysporum*. D-E. زردی و پوسیدگی ریشه ناشی از *Fusarium solani*. F-G. زردی و پوسیدگی ریشه ناشی از *Fusarium equiseti*. H-I. زردی و پوسیدگی ریشه ناشی از *Fusarium proliferatum*. J-K. بوته‌میری و پوسیدگی ریشه ناشی از *Macrophomina phaseolina*. L. پوسیدگی ریشه و طوقه ناشی از *Rhizoctonia solani*.

Fig. 5. Disease symptoms caused by soil-born fungal pathogens isolated from chickpeas. A-C. Yellowing, wilt and discoloration of vascular tissues caused by *Fusarium oxysporum.* D-E. Yellowing and root rot caused by *Fusarium solani.* F-G. Yellowing and root rot caused by *Fusarium equiseti.* H-I. Yellowing and root rot caused by *Fusarium proliferatum.* J-K. Plant death and root rot caused by *Macrophomina phaseolina.* L. Root and collar rot caused by *Rhizoctonia solani.*

از مجموع ۲۰ جدایهٔ *F. equiseti* که همگی در آزمون بیماری‌زایی مورد ارزیابی قرار گرفتند، ۱۴ جدایه موجب ایجاد نشانه‌های زردی و پوسیدگی ریشه در گیاهچه‌های نخود شدند(شکل ۵، F و G). با این حال، میانگین آلودگی ریشه در جدایه‌های مذکور در قیاس با جدایه‌های *F. oxysporum* و *F. solani* شدت کمتری داشت و بر اساس شاخص ۰ تا ۴، معادل ۱/۵۶ بود (شکل ۴).

از مجموع ۱۳ جدایهٔ به‌دست آمده *F. proliferatum* که همگی در آزمون بیماری‌زایی مورد ارزیابی قرار گرفتند، ۹ جدایه موجب ایجاد نشانه‌های زردی و پوسیدگی ریشه در گیاهچه‌های نخود شدند(شکل ۵، H و I). با این حال، میانگین درجهٔ پرآزاری جدایه‌ها بیماری‌زا، بر اساس شاخص ۰ تا ۴، معادل ۱/۱۱ بود(شکل ۴).

سایر گونه‌های فوزاریوم شامل *F. verticillioides* و *F. culmorum* که از نسوج آلوده جداسازی شده بودند، در آزمون بیماری‌زایی، غیربیماری‌زا شناخته شدند. از آنجایی که گونه‌های مذکور بیمارگر ریشهٔ غلات محسوب می‌شوند، به نظر می‌رسد در مورد نخود، صرفاً به عنوان قارچ‌های همراه ریشه مطرح باشند. با توجه به گستردهٔ وسیع کشت غلات در استان و تناوب کشت غلات و نخود، فراوانی این گونه‌ها در خاک‌های استان دور از انتظار نیست.

در این مطالعه همچنین ۱۵ جدایه از *M. phaseolina* و دو جدایهٔ *R.solani* از نسوج بیمار جداسازی شد که بیماری‌زایی آن‌ها به اثبات رسید(شکل ۵، KJ و L). جدایه‌های *M. phaseolina* عمدتاً از مزارع نخود در نواحی گرمسیر جداسازی شدند.

بحث

در این مطالعه، قارچ‌های *F. oxysporum* و *F. solani* چنان‌که در مطالعات سایر محققین به اثبات رسیده است، مهم‌ترین و رایج‌ترین عوامل ایجاد بیماری‌های ریشه و طوقه در نخود بودند(Westerlund *et al.*, 1974; Mohammadi & Banihashemi, 2005; Nene *et al.*, 2012; Jiménez-Díaz *et al.*, 2015). گونه‌های مرکب *F. solani* و *F. oxysporoum* از قارچ‌هایی هستند که در اغلب مناطق آب و هوایی فعالیت می‌کنند(Burgess *et al.*, 1988). پس می‌توان انتظار داشت که در استان کرمانشاه که از تنوع اقلیمی گسترده‌ای برخوردار است، این گونه‌ها در اقلیم‌های مختلف حضور داشته باشند. در این مطالعه، هر دو گونه از شهرستان‌های کنگاور و سنقر که سردترین شهرستان‌های استان کرمانشاه هستند تا مناطق گرمسیری مانند شهرستان‌های سرپل‌ذهاب و قصرشیرین جداسازی شدند.

در آزمون بیماری‌زایی، تعدادی از جدایه‌های منتخب *Fusarium oxysporum*، قادر به ایجاد بیماری در گیاهچه‌های نخود نبودند. ناتوانی برخی از جدایه‌ها در ایجاد بیماری ممکن است ناشی از شرایط آزمون بیماری‌زایی یا به دلیل ناتوانی ذاتی و غیربیماری‌زا بودن جدایه‌های مذکور باشد. قارچ *F. oxysporoum* گونه‌ای مرکب است که طیفی از قارچ‌های بیماری‌زا تا پوده‌زیست را در برمی‌گیرد؛ به گونه‌ای که برخی از جدایه‌های غیربیماری‌زا به منظور کنترل بیولوژیکی سایر عوامل بیماری‌زای خاک‌زاد مورد استفاده قرار می‌گیرند (Kaur *et al.*, 2011).

نشانه‌های بیماری در گیاهچه‌های بیمار که با جدایه‌های *F. oxysporum* مایه‌زنی شده بودند، متغیر بوده و درجات مختلفی از زردی، ریزش برگ‌چه‌ها، بافت‌مردگی و به ندرت پژمردگی در قسمت هوایی گیاهان مورد آزمایش مشاهده شد. در بررسی ریشه گیاهان آلوده، درجات مختلفی از پوسیدگی ریشه مشاهده شد. اما، بر خلاف انتظار، بروز تغییر رنگ آوندی که مشخصهٔ اصلی جدایه‌های بیماری‌زای *F. oxysporum* قارچ است، فقط در تعداد معدودی از گیاهان مایه‌زنی شده مشاهده شد. از سویی دیگر، بروز پوسیدگی ریشه درگیاهان مایه‌زنی شده نیز با نشانه‌های بیماری که از قارچ *F. oxysporum* انتظار می‌رود، سازگار نیست. مقایسهٔ نشانه‌های بیماری ناشی از اغلب جدایه‌های گونهٔ مرکب *F. oxysporum* در این مطالعه، با نشانه‌های بیماری ناشی از گونهٔ *F. redolens* مطابقت دارد. بر اساس مطالعات مولکولی، مشخص شده است که برخی از جدایه‌های به‌دست آمده از نخود که براساس خصوصیات ریخت‌شناختی به عنوان *F. oxysporum* شناسایی شده‌اند، براساس نشانه‌های بیماری و توالی یابی DNA قابل تفکیک از این گونه بوده و به گونه *F. redolens* تعلق دارند(Jiménez-Fernández *et al.*, 2011). با این‌حال، شناسایی دقیق این جدایه‌ها مستلزم ترکیبی از مطالعات مولکولی و بررسی‌های دقیق ریخت‌شناسی است.

با توجه به مرکب بودن F. oxysporum اتکا به ویژگی‌های ریخت‌شناختی برای شناسایی گونه‌های مرکب مانند F. oxysporum، ممکن است منجر به شناسایی اشتباه بیمارگر شود. این در حالی است که شناسایی دقیق بیمارگر برای مدیریت کارآمد بیماری بسیار مهم است. مطالعات ریخت‌شناختی گونه‌های Fusarium مبتنی بر تعداد محدودی از خصوصیات تاکسونومیکی با تفاوت‌های جزئی است که

اهمیت این صفات در گونه‌های مختلف فوزاریوم متغیر است. به علاوه این صفات به شرایط محیطی بسیار حساسند و تحت تأثیر آن قرار می‌گیرند. ناپایداری این صفات و اختلاط و درهم آمیختن مرزهای هر صفت در گونه‌های مختلف، امکان شناسایی صحیح را کاهش می‌دهد(Leslie et al., 2001).

در آزمون بیماری‌زایی، تعدادی از جدایه‌های *F. equiseti* و *F. proliferatum* موجب ایجاد نشانه‌های زردی و پوسیدگی ریشه در گیاهچه‌های نخود شدند. با این حال، میانگین آلودگی ریشه در جدایه‌های مذکور در قیاس با جدایه‌های *F. oxysporum* و *F. solani* شدت کمتری داشت. با این توصیف، گونه‌های مذکور در نخود بیمارگرهای کم اهمیتی محسوب می‌شوند. گونۀ *F. equiseti* یکی از گونه‌هایی است که معمولاً از نخودهای بیمار جدا می‌شود(Nene *et al.*, 1996). بیماری‌زا بودن این گونه در مطالعات محمدی و بنی‌هاشمی نیز به اثبات رسیده است(Mohammadi & Banihashemi, 2005). اما گونۀ *F. proliferatum* هر چند پیش از این نیز از ریشه نخود جداسازی شده است (Mohammadi & Banihashemi, 2005)، اما این اولین گزارش از بیماری‌زایی این گونه روی نخود است.

سایر گونه‌های فوزاریوم شامل *F. verticillioides* و *F. culmorum* که از نسوج آلوده جداسازی شده بودند، در آزمون بیماری‌زایی، غیربیماری‌زا شناخته شدند. از آنجایی که گونه‌های مذکور بیمارگر ریشۀ غلات محسوب می‌شوند، به نظر می‌رسد در مورد نخود، صرفاً به عنوان قارچهای همراه ریشه مطرح باشند. با توجه به گستردۀ وسیع کشت غلات در استان و تناوب کشت غلات و نخود، فراوانی این گونه‌ها در خاک‌های استان دور از انتظار نیست.

در این مطالعه همچنین تعدادی جدایه از *M. phaseolina* و دو جدایۀ *R.solani* از نسوج بیمار جداسازی شد که بیماری‌زایی آن‌ها به اثبات رسید. جدایه‌های *M. phaseolina* عمدتاً از مزارع نخود در نواحی گرمسیر جداسازی شدند. با توجه به ماهیت بیمارگر که دمای بهینه رشد آن ۲۸ الی ۳۵ درجه سلسیوس می‌باشد و در شرایط تنش رطوبت موجب بروز خسارت می‌شود(Ndiaye, 2007)، کاملاً طبیعی است که وقوع بیماری و خسارت آن در شهرستان‌های گرمسیر استان کرمانشاه قابل توجه باشد.

نتیجه‌گیری

نتایج این مطالعه نشان داد که گونه‌های فوزاریوم عامل اصلی ایجاد زردی و پوسیدگی ریشه نخود در استان کرمانشاه هستند. در این میان، گونۀ مرکب *F. oxysporum* رایج‌ترین و پرآزارترین گونۀ بیمارگر است. با این حال به استناد نتایج آزمون بیماری‌زایی، بیشتر جدایه‌های *F. oxysporum* که در این مطالعه مورد ارزیابی قرار گرفتند، بر خلاف گزارش‌های پیشین به فرم مخصوص *F. oxysporum* f. sp. *ciceri* تعلق ندارند. با توجه به مرکب بودن *F. oxysporum* اتکا به ویژگی‌های ریخت‌شناختی برای شناسایی این بیمارگر، ممکن است به شناسایی نادرست منجر شود. این در حالی است که شناسایی دقیق بیمارگر برای مدیریت کارآمد بیماری بسیار مهم است. بنابراین به منظور تدوین درست اقدامات مدیریتی لازم است شناسایی دقیق این بیمارگر با استفاده از روش‌های مولکولی تأیید گردد. نتایج این مطالعه همچنین نشان داد که *F. proliferatum* یک بیمارگر ضعیف ریشۀ نخود است. این اولین گزارش از بیماری‌زایی *F. proliferatum* بر روی نخود محسوب می‌شود.

منابع

1. Ahmadi, K., Ebadzadeh, H.R., Abdeshah, H., Kazemian, A. and Rafiee, M. 2018. Agricultural Statistics 2017-2018: Volume 1, Field Crops, in: Agriculture, I. M. o. (Ed.). Iranian Ministry of Agriculture, Statistics, p. 117.
2. Aoki, T .O'donnell, K. and Geiser, D.M. 2014. Systematics of key phytopathogenic *Fusarium* species: current status and future challenges. Journal of General Plant Pathology 80: 189-201.
3. Aslam, M., Mahmood, I., Peoples, M .,Schwenke, G. and Herridge, D. 2003. Contribution of chickpea nitrogen fixation to increased wheat production and soil organic fertility in rain-fed cropping. Biology and Fertility of Soils 38: 59-64.
4. Bueno, C. Fischer, I. Rosa, D. Firmino, A. Harakava, R. Oliveira, C. and Furtado, E. 2014. *Fusarium solani* f. sp. *passiflorae*: a new forma specialis causing collar rot in yellow passion fruit. Plant pathology 63: 382-389.
5. Burgess, L.W.L., Summerell, C.M. and Brett, A. 1988 .Laboratory Manual for *Fusarium* Research. University of Sydney.

6. Chung, W., Chen, L., Huang, J., Huang, H., and Chung, W. 2011. A new ‘forma specialis’ of *Fusarium solani* causing leaf yellowing of Phalaenopsis .Plant pathology 60: 244-252.
7. Chand, H. and Khirbat, S. 2009. Chickpea wilt and its management–A review. Agricultural Reviews 30: 1-12.
8. Fao. 2017. FAOSTAT, Statistical Database of the United Nation Food and Agriculture Organization (FAO) Statistical Division. Rome, Italy**.** Available at: http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC. Accessed Nov, 2019.
9. Fisher, N.L., Burgess, L., Toussoun, T. and Nelson, P.E. 1982. Carnation leaves as a substrate and for preserving cultures of *Fusarium* species. Phytopathology 72: 151-153.
10. Gordon, T. and Martyn, R. 1997. The evolutionary biology of *Fusarium oxysporum*. Annual Review of Phytopathology 35: 111-128.
11. Jiménez-Díaz, R.M., Castillo, P., del Mar Jiménez-Gasco, M., Landa, B.B. and Navas-Cortés, J.A. 2015. Fusarium wilt of chickpeas: Biology, ecology and management. Crop Protection 73: 16-27.
12. Jiménez-Fernández, D ,.Navas-Cortés, J.A., Montes-Borrego, M., Jiménez-Díaz, R.M. and Landa, B.B. 2011. Molecular and pathogenic characterization of *Fusarium redolens*, a new causal agent of Fusarium yellows in chickpea. Plant Disease 95: 860-870.
13. Kaur, R., Kaur, J. and Singh, R.S. 2011. Nonpathogenic Fusarium as a biological control agent. Plant Pathology Journal 9: 79-91.
14. Kolattukdy, P. 1995. Nectria haematococca. Pathogenesis and Host Specificity in Plant Diseases: Histochemical, Biochemical, genetic and Molecular Bases, Vol. II Eukaryotes: 83-101.
15. Landa, B.B., Navas-Cortés, J.A., del Mar Jimenez-Gasco, M., Katan, J., Retig, B. and Jiménez-Díaz, R.M. 2006. Temperature response of chickpea cultivars to races of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*, causal agent of Fusarium wilt. Plant Disease 90: 365-374.
16. Leslie, J.F. and Summerell, B.A. 2008. The Fusarium laboratory manual. John Wiley & Sons.
17. Leslie, J.F., Zeller, K.A. and Summerell, B.A. 2001. Icebergs and species in populations of Fusarium. Physiological and Molecular Plant Pathology 59: 107-117.
18. Matuo, T. and Snyder, W.C. 1973. Use of morphology and mating populations in the identification of formae speciales in *Fusarium solani* .Phytopathology 63: 562-565.
19. Mohammadi, H. and Banihashemi, Z. 2005. Distribiution, pathogenicity and survival of Fusarium spp. The causal agents of chickpea wilt and root rot in the Fars province of Iran. Iranian Journal of plant pathology 41: 688-708 (in Persian with English Summary).
20. Muehlbauer, F.J. and Sarker, A. 2017. Economic importance of chickpea: production, value, and world trade, pp. 5-12, The chickpea genome. Springer
21. Ndiaye, M .۲۰۰۷ .Ecology and management of charcoal rot (*Macrophomina phaseolina*) on cowpea in the Sahel. Ph.D Thesis, Wageningen University, the Netherland. 114 pp.
22. Nene, Y., Reddy, M., Haware, M., Ghanekar, A., Amin, K., Pande, S. and Sharma, M. 2012. Field Diagnosis of Chickpea Diseases and their Control. Information Bulletin No. 28 (revised). International Crops Research Institute for the Semi-Arid Tropics.
23. Nene, Y., Sheila, V. and Sharma, S. 1996. A world list of chickpea and pigeonpea pathogens (5th edn). International Crops Research Institute for the Semi-arid Tropics: Andhra Pradesh, India.
24. O'Donnell, K., Cigelnik, E .and Nirenberg, H.I. 1998. Molecular systematics and phylogeography of the *Gibberella fujikuroi* species complex. Mycologia 90: 465-493.
25. Sneh, B., Burpee, L. and Ogoshi, A. 1991. Identification of *Rhizoctonia* species. APS press, Minnesota, USA, pp. 133.
26. Snyder, W.C. and Hansen, H. 1940. The species concept in *Fusarium*. American Journal of Botany 27: 64-67.
27. Westerlund, F., Campbell, R. and Kimble, K. 1974. Fungal root rots and wilt of chickpea in California. Phytopathology 64: 432-436.

Iranian Journal of Pulses Research
Homepage: **https://ijpr.um.ac.ir**
Vol. 14, No. 1, June 2023, p. 63-74 (Original Research Article)




Etiology of root rot, yellows and wilt diseases of chickpea in Kermanshah province

Geraminasab[1], Bahman; Abbasi[2*], Saeed; Jamali[3], Samad; Chehri[4], Khosrow; and Younesi[5], Hassan

1. MSc. in Plant Pathology, Department of Plant Protection, Razi University, Kermanshah; bahman_geraminasab@yahoo.com
2. Associate Professor of Plant Pathology, Department of Plant Protection, Razi University, Kermanshah; abbasikhs@yahoo.com
3. Assistant Professor of Plant Pathology, Department of Plant Protection, Razi University, Kermanshah; jamali454@yahoo.com
4. Assistant Professor of Mycology Department of Biology, Razi University, Kermanshah; hchehri@gmail.com
5. Research Instructor of Plant Pathology, Agricultural and Natural Resources Research Center of Kermanshah Province, Kermanshah; hunesi920@yahoo.com

The Dates:
Received: 10 October 2020; **Revised:** 19 February 2022
Accepted: 24 May 2022; **Available Online:** 22 June 2023

How to cite this article:
Geraminasab, B., Abbasi, S., Jamali, S., Chehri, Kh., and Younesi, H. 2023. Etiology of root rot, yellows and wilt diseases of chickpea in Kermanshah province. Iranian Journal of Pulses Research 14(1): 63-74. (In Persian with English abstract). DOI: 10.22067/ijpr.v14i1.89106

Introduction

Chickpea is a valuable and protein-rich pulse crop which is widely cultivated in more than 50 countries. Cultivation of chickpea in rotation with cereals can improve soil fertility through the process of symbiotic nitrogen fixation. Among the chickpea producing provinces in Iran, Kermanshah province has the first rank of chickpea production. Root rots and wilt have been considered the most devastating diseases limiting chickpea production in Kermanshah Province. However, the etiology of these diseases has not been thoroughly investigated. Therefore, the present study aimed to identify the fungal species causing wilt, yellowing and root rot in Kermanshah province, identify the dominant species and determine the prevalence of the disease in different regions of the province.

Materials and Methods

One hundred ninety-four chickpea fields, representative of the main planting areas throughout Kermanshah province, were surveyed during growing seasons 2011-2015. In each field, at least four diseased plant samples showing yellowing or wilting symptoms were collected, kept in paper bags, and transferred to the laboratory. 5 mm long pieces of root and stem of affected plants were prepared, surface sterilized and plated on Water Agar. The culture plates were incubated at a temperature of 25°C and examined on a daily basis. Pure cultures were obtained using either the hyphal-tip or single spore techniques. The isolates were then morphologically identified using available descriptions from the literature. Out of the abundant isolates, a total of 288 were selected for further investigation regarding their pathogenicity and aggressiveness. To prepare the inoculum, oat seeds were soaked in water for 24 hours and then transferred to 500 ml flasks. The flasks were autoclaved at a temperature of 121°C for 20 minutes, twice on two consecutive days. Each fungal isolate was cultured on five plates containing Potato Dextrose Agar (PDA) medium. Then, the autoclaved oat seeds were added to the plates. The plates were then incubated at 25°C for two weeks until the fungus completely covered the seeds surface. The pots (4 cm in diameter and 12 cm in height) were filled to a height of 6 cm with an autoclaved soil mixture (field soil / sand at a ratio of 2:1), then 2 ml of inoculum was applied to the soil surface, the inoculum was covered with one cm of autoclaved soil, the two seeds of chickpea

* **Corresponding Author:** abbasikhs@yahoo.com

cultivar, Bivanij were placed on the soil surface, Finally, the seeds were covered with 2 cm of soil. In this test, three replicates were considered for each isolate. The control pots were mock inoculated with uninfested oat seeds. The pots were kept in the growth chamber for a maximum of five to six weeks at 25-28 ° C. The disease severity was rated according to a 0-4 scale.

Results and Discussion

Based on morphological characteristics, eight fungal species including *Fusarium oxysporoum*, *F. solani*, *F. equiseti*, *F. proliferatum*, *F. verticillioides*, *F. culmorum*, *Macrophomina phaseolina* and *Rhizoctonia solani* were identified. Based on the results of pathogenicity test, except for *F. verticillioides* and *F. culmorum* other species were identified as pathogenic. Among these, *F. oxysporum* and *F. solani* species complex were classified as the most common and most aggressive pathogens. *F. equiseti* and *F. proliferatum* were ranked as weakly aggressive pathogens. In this study, vascular discoloration, a major characteristic of the pathogenic isolates of *F. oxysporum*, was observed in only a few inoculated plants suggesting that most of the recovered isolates did not belong to *F. oxysporum* f. sp. *ciceri*. Disease symptoms triggered by most of the isolates of *F. oxysporum* species complex in this study are consistent with those of *F. redolens*. However, accurate identification of these isolates requires a combination of molecular protocols and detailed morphological studies.

Conclusion

Our results showed that *Fusarium* species are the main agent causing root rot, yellowing and wilt on chickpea in kermanshah province. Among these, *F. oxysporum* species complex was the most common and most aggressive species. However, contrary to previous reports, most of the *F. oxysporum* isolates examined in this study did not belong to *F. oxysporum* f. sp. *ciceri*. Since the accurate pathogen identification is crucial for efficient disease management, accurate identification of the pathogen needs to be confirmed using molecular protocols. We also concluded that *F. proliferatum* is a weak pathogen of chickpea root. This is the first report of pathogenicity of *F. proliferatum* on chickpeas.

Keywords: Fusariosis، *Fusarium*، *Macrophomina*، *Rhizoctonia* ،Yellowing